

马铃薯抗病毒病育种研究进展

王晓明¹, 金黎平², 尹江¹

(1. 河北省高寒作物研究所, 河北 张北 076450; 2. 中国农科院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要: 马铃薯病毒病影响马铃薯的产量和品质, 是影响马铃薯产业发展的重要因素。本文介绍了马铃薯病毒病的危害、抗病毒病育种的意义, 综述了马铃薯抗病毒病育种的方法, 这些方法有利用四倍体抗病毒基因的常规育种、利用野生种和原始栽培种抗病毒基因的倍性育种以及抗病生物工程育种, 并对今后的研究提出了建议。

关键词: 马铃薯; 抗病毒病; 育种

马铃薯病毒病影响马铃薯的产量和品质, 是影响马铃薯产业发展的重要因素, 解决马铃薯病毒病的危害是保证马铃薯产业健康发展的必要条件。马铃薯抗病毒育种能有效控制病毒对马铃薯的危害, 是解决马铃薯病毒病危害、保证马铃薯产业发展的有效手段。

1 马铃薯病毒病的危害、抗病毒病育种的意义

马铃薯受病毒侵染后发生退化, 造成产量降低、品质下降, 每年世界上由马铃薯病毒造成的减产至少为 20%。2003~2004 年的全国马铃薯产品质量安全普查发现, 病毒病仍是造成脱毒种薯不合格的重要原因之一。危害马铃薯的病毒有 30 余种, 其中在我国普遍存在而且危害严重的见表 1^[1]。

病毒在影响马铃薯产量的同时也影响质量, 造成块茎品质下降, 如高感 PLRV 的马铃薯块茎薯肉中会有明显的坏死组织; 感 PSTVd 植株所结块茎细长、两端略尖、形同纺锤; PVY 的一些株系造成在块茎上产生环斑坏死或淡褐色环。马铃薯常规育种过程中, 育成一个品种需要 8~10 年, 在此期间由于病毒侵染的影响, 造成对品系的评价与其生产潜力有一定的差距, 从而影响到育种工作的效率。

茎尖脱毒组织培养技术可生产病毒含量很低的种薯。在严格的生产管理条件下, 由经检测合格的

脱毒苗可以生产接近无毒的种薯。但茎尖脱毒组织培养技术本身也有以下局限性: 成本高, 因为需要脱毒组培设备、器具, 独立清洁的环境, 对人员也有较高的要求; 受脱毒技术和病毒检测技术的影响, 检测合格的脱毒苗未必真正没有病毒, 如脱毒苗带病毒, 病毒会在脱毒苗的继代过程中增殖, 造成脱毒苗的退化; 脱毒后的种薯易在栽培过程中受耕作措施及蚜虫的侵染而重新感染病毒; 脱毒易造成品种的变异, 且在继代过程中可能发生机械混杂; 受经济、认知、良种繁育推广体系等的影响, 马铃薯脱毒种薯尚未能全面应用于生产。

表 1 我国马铃薯主要病毒病及对产量造成的影响

病 毒	对产量造成的影响(%)
马铃薯卷叶病毒(PLRV)	40~60
马铃薯 Y 病毒(PVY)	50 左右
马铃薯 Y 病毒(PVY)+马铃薯 A 病毒(PVA)	80 左右
马铃薯 X 病毒(PVX)	10~50
马铃薯 A 病毒(PVA)	与 PVY 复合侵染造成严重危害
马铃薯 S 病毒(PVS)	10~20
马铃薯类病毒 PSTVd	20~35 , 严重时 60

马铃薯实生种子虽成本低廉且有摒除自身病毒的作用, 但仍可传播 PSTVd 和马铃薯 T 病毒, 同时产量低、产品质量不一致, 只适用于一些经济、交通落后, 对马铃薯商品质量要求不高的地区。

收稿日期: 2005- 08- 10
作者简介: 王晓明(1974-), 男, 河北省高寒作物研究所助理研究员, 从事马铃薯新品种选育工作。

马铃薯组织培养茎尖脱毒技术和马铃薯实生种子的应用虽可有效降低病毒的危害,但鉴于我国目前的马铃薯种薯质量水平及经济、认知、良种繁育推广体系等的影响,选育和种植抗病毒品种仍是目前成本最低、减少病毒危害的有效途径。

2 抗病毒育种技术

2.1 常规育种

常规育种即杂交转育。有一些育种材料经过深入的遗传和应用研究,证明是抗病毒的。在1983年出版的《马铃薯品种资源编目》中,有一批材料具有抗病毒病的特性。表2列出其中的部分材料^[2]。利用这些材料与其它四倍体栽培种杂交,后代通过相应的病毒选择压选择抗病毒病的后代,实现抗病毒目的基因的转入,从而获得抗病毒病的品系(种)。如春薯2号由高原7号×卡它丁育成,抗卷叶;高原8号由高原5号×卡它丁育成,抗花叶;丰收白由小叶子×疫不加育成,抗Y病毒。

表2 《马铃薯品种资源编目》中部分材料对病毒病的抗性

品种(品系)名称	对病毒病的抗性
小叶子	抗PVY
西薯1号	抗PVY
361	抗PVY
乌盟691	抗束顶
丰收白	抗PVY
东农303	高抗花叶
北薯1号	高抗花叶
克新1号	高抗PLRV、抗PVY
沙杂15号	抗PVY
巫峡	抗PVA
坝薯9号	抗PVY
郑薯2号	抗PVY
呼薯1号	抗PVY和束顶
内薯2号	抗PVX、PVY
七百万	抗PVY
火玛	抗PLRV
卡他丁	抗PVA、PVY
西北果	对PVA免疫
疫不如	抗PVY、PLRV
疫畏他	抗PVY、PLRV

一些遗传规律的研究为抗病毒育种提供了高效的途径,如尹江等^[3]在马铃薯抗PLRV育种的家系遗传分析中指出:在抗PLRV育种中,抗PLRV应选择一般配合力负值高的母本和特殊配合力负值高的父本的组合。孟兆军等^[4]在抗性筛选方面,以连续多年种植的各品系(种)相邻年度病毒病感染率均值与病指增长百分率均值的乘积(DR)值作为主要评判指标,以主要经济性状和产量的相邻年度递变百分率代数和作为参考值,可对新育品种对病毒病的水平动态抗性给予评判,以利提高早代选择的准确性,以期选出对病毒病水平动态抗性较高的品种。在抗PVY育种中^[5],栽培品种中对PVY⁰和PVY^N两个株系具有过敏性的类型较少,但许多品种具有受多基因控制的田间抗性,如燕子(Schwalbe)。育种实践证明,利用燕子作为亲本之一的组合所获得的杂交后代对PVY具有较强的田间抗性。内蒙古大学和内蒙古自治区乌兰察布盟农业科学研究所对燕子×卡它丁组合的75株系F₁实生苗经过接种筛选,无病毒症状的29株,占总数的38.6%。1个月后,对无症状的实生苗重复接种,仍有48.3%的个体对PVY具有较高水平的抗性。

安第斯栽培种遗传变异类型较多,能够分离出多种抗源,如对PVX、PVY、PVA、PLRV等病毒的抗性。国际马铃薯中心(CIP)于20世纪80年代对其保存的安第斯栽培种资源进行了评估,表3显示了具有对病毒抗性的材料^[6]。

表3 国际马铃薯中心对安第斯栽培种资源材料的评估

评价的性状	参加评估材料数量	具有抗性基因的材料	
		数 量	%
PVX	627	181	25.97
PVY	601	41	6.82
PLRV	1112	27	2.43

20世纪60年代前期Simmonds从秘鲁、玻利维亚及哥伦比亚等地广泛搜集适应短日照的安第斯亚种的许多类型,种植在长日照条件下进行轮回选择,经过5个轮次,选出适应长日照结薯的新型栽培种^[6]。与普通栽培种相比,新型栽培种仍带有许多不良性状,如植株高大、成熟期迟、地上分枝多、地下匍匐茎长、单株块茎数多而小、

薯形不规则、芽眼深等, 很难在常规育种中直接利用。为此, 我国根据不同纬度、不同生态条件对引进的新型栽培种(1974)进行了多次轮回选择。经过改良后的新型栽培种群体, 与普通栽培种群体相比, 在主要农艺性状上都十分相近, 为直接利用创造了良好的条件。轮回选择表明, 在改良后的新型栽培种群体中, 筛选出了一些高淀粉、高蛋白、高维 C、低还原糖的无性系, 另外, 在新型栽培种中普遍保持茎叶田间抗晚疫病的基础上, 又获得了一批抗青枯病及主要病毒病(PVX、PVY、PLRV)的无性系。近年来, 一些单位利用选育出含有新型栽培种血缘的杂种无性系作亲本, 比直接利用新型栽培种作亲本在育种中取得了更好的效果。在 20 多年的时间里, 利用新型栽培种共育成 19 个品种^[6], 这些新品种均比当地主栽品种增产 10% 以上, 对晚疫病、青枯病、主要病毒病的抗性增强。选育出一些抗病毒病品种如中薯 4 号(抗 PVX、PVY)、州芋 2 号(抗抗 PVX、PLRV)、克新 11 号(较抗 PLRV)。

2.2 倍性育种

野生种和原始栽培种的资源相当丰富, 具有抗逆、抗病、低还原糖等许多优良品质, 将它们有利基因转育到栽培种中, 克服普通栽培种遗传基础狭窄的问题, 具有重要的意义。抗病毒病的基因广泛存在于以下野生种和原始栽培种^[9]。

表 4 部分对病毒病有抗性的种

抗病毒种类	种
PVX	Sacaula, Schacoense, Sphureja, Ssucrense, Starijense, Ssparsipihum, Stubersum subsp.andigena 等
PVY	Schacoense, Sphureja, Sstoloniferum, Sdemissum, Stubersum subsp.andigena
PLRV	Sbrevdens, Setuberosum, Sacaula, Sraphanifolium
PSTV	Sacaula (来自秘鲁的有较好的抗性), Sberthaultii, Sgurreroense

但野生种和原始栽培种大多是二倍体, 与普通栽培种由于胚乳平衡数不同存在着杂交障碍, 限制着二倍体资源的利用, 通过倍性操作可以把二倍体资源中有利基因导入到四倍体中。

2.2.1 二倍体水平上病毒病抗性的遗传改良

利用二倍体中筛选的“诱导者”作父本与普通栽培种杂交, 诱导四倍体普通栽培品种孤雌生殖

产生二倍体(2x)双单倍体, 或通过普通栽培种花药的离体培养, 利用植物花粉潜在的全能性诱导单倍体产生二倍体(2x)双单倍体。将获得的这些双单倍体材料与二倍体野生种和原始栽培种资源杂交, 获得二倍体种间杂种, 并应用轮回选择、回交、复交等育种技术在二倍体水平上对群体进行遗传改良, 富集更多的优良基因, 获得免疫或高抗多种马铃薯病毒病的二倍体育种材料, 并扩大遗传背景, 加强杂种优势, 获得更优异的马铃薯杂种群体。

2.2.2 利用 2n 配子将二倍体的抗性转育到四倍体品种中

在高等植物中, 2n 配子的发生是一种比较普遍的生物学现象, 已经先后在曼陀罗、玉米、大麦、马铃薯、苜蓿等^[7]作物中发现 2n 配子存在。这种现象由减数分裂行为异常造成, 分裂后的配子具有与原细胞相同的染色体数。利用这些二倍体产生 2n 配子(2n=2x=24)的能力与四倍体栽培种(其配子 n=2x=24)杂交, 得到四倍体杂种后代, 将二倍体的优良性状转育到栽培种四倍体中, 在四倍体水平上利用杂交后代中的二倍体的优良基因, 并进一步进行遗传改良, 这称为单向有性多倍化; 也可用双向有性多倍化, 即用二倍体产生 2n 卵子和 2n 花粉的能力, 进行二倍体间杂交产生四倍体后代, 再用它与四倍体栽培种杂交, 从而在四倍体水平上利用杂交后代中二倍体亲本的优良基因。

目前应用于实际育种研究的 2n 配子材料大多从 S phureja, S chacoense, S infundibuliforme, S sanctae-rosae, S turijense, S serrana 等种或这些种与普通四倍体双单倍体的杂种中选育而成, 其中最著名的材料^[7]有 US5293.3, USW5295-7, USW5337-3, USW7589-2, 77-2102-73。已经发现许多二倍体野生种和近缘栽培种以及他们与普通栽培种的双单倍体杂交产生的 HS 杂种可以产生 2n 配子^[9], 从 20 世纪 80 年代中期以来, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所已筛选出了一批农艺性状优良、稳定地高频率地产生 2n 花粉的材料, 包括 DY-1-50, QCE40-9, QCE-55-26 等, 我国内蒙古自治区农业科学院选择获得了 4 份优良的孤雌生殖诱导材料, 并进行 4x-2x 杂种的创新, 实现了野生种优良基因(抗 PVX、PVY、PLRV)的转移^[7]。

2.2.3 二倍体资源通过化学方法加倍获得四倍体与普通栽培种杂交转育抗病基因

黑龙江省农业科学院马铃薯研究所^[9]采用秋水仙素加倍的方法, 加倍野生种 *S. chacoense*, *S. demissum*, *S. stoloniferum*, *S. acaule*, 并将抗病基因转育到四倍体栽培种中, 并经 3~4 代轮回选择, 选育出抗 PVY 材料 40 份, 抗 PVX 材料 35 份。

2.3 生物工程育种

2.3.1 基因工程

(1)CP 基因的利用: 1929 年, Mckinney 发现感染了温和病毒株的植物能够抵抗同种或相关的烈性病毒株的感染, 这种现象叫做交叉保护作用。近年来发现表达正链 RNA 病毒外壳蛋白基因的转基因植株中, 也观察到类似的保护作用, 并自 1986 年来, 病毒外壳蛋白介导的抗病性已成为植物抗病毒基因工程的一条成功途径。

宋艳茹等^[10]将 PVY 外壳蛋白基因通过致瘤农杆菌介导转化马铃薯品种 Favorita、虎头和克新 4 号。试验结果表明, 转基因马铃薯植株染色体上整合有 PVY CP 基因, 并且转基因马铃薯植株中 PLRV 增殖情况较未转录基因的对照有所降低, 同时转基因马铃薯生长发育正常, 部分植株单株产量高于未转基因的马铃薯。

崔晓江等^[11]得到 3 个单价抗病毒植物表达载体, 以 Favorita 和虎头为供试品种, 转化后的马铃薯以 PCR 方法检测, 发现有些转基因马铃薯只含有 2 个 CP 基因(PVX 和 PVY), 甚至 1 个(PVY), Favorita 和虎头的 3 价转化率都在 20%左右。

(2)利用缺损的复制酶基因介导的抗病性: 研究表明, 向植物体内转入缺损的病毒复制酶基因, 表达出的无功能的缺损复制酶可以与有功能的复制酶相互竞争, 从而干扰病毒的正常复制。

以马铃薯 Y 病毒中国分离株(PVY-C)的 mRNA 作为模板获得了 PVY-C 的核内含体 b(Nib)全长 cDNA 克隆^[12]。在对其进行全序列分析的基础上, 构建了 PVY-C Nib 基因全长, 5 端缺失 381 个碱基和 Nib 反义 RNA 3 种不同形式高等植物表达载体。在土壤农杆菌的介导下, 转化烟草生产品种 NC89, 获得了所有三种表达载体的转基因植株。通过检测发现, 不同形式的 Nib 基因序列的转基因植株对马铃薯 Y 病毒表现不同程度的抗性。其中, 以 5 端缺失的 Nib 的基因转化植株表现最好, 从总

共 20 个这类转化株系中筛选到 4 个株系至少在 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PVY-C 接种浓度下, 表现完全的抗病效果。从总共 39 个全长 Nib 基因转化株系中, 仅有一个株系, 在 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PVY-C 的攻毒接种下具有完全的抗病性。所有 33 个 Nib 基因反义 RNA 的转化植株中, 无一株系表现完全的抗病效果, 但是有部分株系能不同程度地延缓或减轻发病程度, 并有部分植株在发病后 50 d 左右有恢复健康的趋势。

(3)干扰运动蛋白: 病毒在植物体内的传播主要依赖于蛋白运动, 运动蛋白可与胞间连丝相互作用, 促进病毒在细胞间的转移。如果能够干扰或阻碍运动蛋白与胞间连丝的结合, 就可以阻止病毒在植物体内的扩散, 将已侵入植物体内的病毒局限在最初的侵染部位, 从而达到抗病毒的目的。

研究证明^[13], 马铃薯 PVY 病毒属病毒基因组编码的 HC-PRO 蛋白(蚜传辅助因子)具有多种功能, 在病毒生活史各个环节起重要作用。HC-PRO 蛋白具有蛋白酶活性, 作为蚜传辅助因子参与病毒蚜传过程, 调节病毒在宿主体内的转移, 并在病毒复制、宿主症状表达及增强异源病毒复制方面发挥作用。由此可根据其特性设计新的抗病毒策略。

(4)RNA 和反义 RNA 介导的抗性: 研究证明, 用非翻译的序列转化植株也能产生抗性, RNA 与反义 RNA 转化阻碍翻译的进行, 导致基因产物减少。马铃薯 PLRV 是正链 RNA 病毒, 基因组全长 6.0kb, 整个基因组分为 5 端编码区和 3 端编码区, 中间一段为长 197kb 的非编码区, 称为基因间隔区 IS。董丽江等^[14]合成克隆 PLRV-CH IS 序列 cDNA 以正向和反向两种方式分别构建到植物转化载体 PROK2 中, 转化了马铃薯获得转基因植株, 并以带毒桃蚜接种测试。实验表明, 表达 IS 区正义和反义的转基因植株, 接种病毒后无症状, 或症状较轻。用 ELISA 测定转基因植株中 PLRV 浓度, 均较未转基因对照植株低。表达正义 RNA 的转基因植株 PLRV 浓度降低 43%~72%, 表达反义 RNA 的转基因植株降低 72%~86%。表达 IS 区反义 RNA 的转基因植物对 PLRV 抗性较强。

(5)核酶: 核酶是一种能特异切割 RNA 的 RNA, 依据已知的病毒基因组的特定区域序列设计 R2, 使它能够特异地识别, 切割病毒的特异区域, 从而切断病毒基因组, 破坏其生物能力, 达到抗病

毒的目的。LAMB、郭旭东、杨静华等分别设计了特异切割 PLRV RNA 的核酶并实现体外切割^[15]。除此外, 已设计合成切割 PLRV 复制酶基因负链双切点双体核酶和突变核酶 cDNA, 分别构建于植物表达载体中, 用于马铃薯转化。杨希才等^[16]将人工合成的核酶基因介导特异切割的 PSTVd RNA 转入马铃薯, 获得了抗 PSTVd 的转基因马铃薯。

2.3.2 体细胞融合和杂交技术

植物体细胞融合和杂交技术兴起于上世纪 70 年代, 无论在应用研究还是操作技术上取得了长足的进步。该技术可以解决通过有性杂交难以解决的问题, 通过马铃薯的优良双单倍体与二倍体野生种的原生质体融合, 将野生种所具有的优良抗性基因转移到马铃薯栽培种中, 从而为利用马铃薯家族野生种的丰富优良抗性基因开辟了一条新途径; 同时, 通过不同的优良双单倍体之间的原生质体进行自体融合, 可在短期内高频率地获得染色体加倍的四倍体。Austin 获得了 *S. phureja* 和 *S. phureja*/*S. stenotomum* 的原生质体融合杂种并筛选到抗 PLRV 的个体。可是体细胞杂交也带有育性问题及不需要的野生性状, 这种矛盾也许会被解决, 如利用部分基因转移技术, 即不对称原生质融合。

2.3.3 分子标记辅助选择

传统的作物育种方式是基于植物的表现型来进行选择的, 具有很多的局限性。分子标记辅助选择 (Molecular marker - assisted selection, 简称 MAS) 是现代分子生物学与传统遗传育种的结合点, 借助分子标记可以对育种材料从 DNA 水平上进行选择, 从而达到作物产量、品质和抗性等综合性状的高效改良。目标基因与分子标记紧密连锁为利用分子标记间接选择提供了方便。在育种中通过基因定位找到与目标基因紧密连锁的分子标记后, 就可以通过该分子标记达到间接选择目标性状, 大大缩短了育种时间。目前, 该技术不仅在小麦、玉米、棉花和大豆等主要农作物上得以应用, 而且在蔬菜 (番茄、马铃薯、鹰嘴豆等) 以及植物基因组研究的模式植物拟南芥上广泛应用^[17]。随着 AFLP 的改进和完善, 它在作物遗传育种中将发挥越来越重要的作用。

3 结 语

现在马铃薯育种方法仍以常规育种为主, 以生

物技术育种为辅, 二者必须紧密结合。要重视抗病毒病遗传研究, 加强在抗病毒病资源改良和抗病毒病品种选育方面的工作, 充分利用丰富的二倍体资源来拓宽育种资源的遗传背景。常规育种应逐渐摆脱经验主义, 借助现代技术手段, 从依靠表现型选择向基因型发展。生物技术尚有其局限性, 对少数基因控制的基因的改良尚可, 对由多数基因控制的经济性状的改良还需要依靠常规育种。育种者在开展常规育种的同时, 要紧密关注生物技术的发展, 将一切成熟的可提高育种效率的生物技术方法和手段都用于常规育种。

[参 考 文 献]

- [1] 金黎平, 屈冬玉. 马铃薯优良品种及丰产栽培技术 [M]. 北京: 中国劳动社会保障出版社, 2002.
- [2] 杨鸿祖, 滕宗璠, 李其文, 等. 全国马铃薯品种资源编目 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1983.
- [3] 尹江, 孟兆军, 杨树梅, 等. 马铃薯抗 PLRV 育种的系谱遗传分析 [J]. 中国马铃薯, 2001, 15(5): 265-270.
- [4] 孟兆军, 张希近, 尹江, 等. 马铃薯抗病病毒育种的病毒累积再感染动态评判 [J]. 马铃薯杂志, 1999, 13(4): 214-216.
- [5] 孙慧生. 马铃薯育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [6] 陈伊里, 石瑛, 王凤义, 等. 新型栽培种在中国马铃薯育种中的利用 [A]. 陈伊里. 中国马铃薯研究与产业开发 [C]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2003, 70-76.
- [7] 郝刚, 纪颖彪, 屈冬玉, 等. 马铃薯 2n 配子利用研究进展 [J]. 马铃薯杂志, 1998, 12(2): 111-118.
- [8] 屈冬玉, 朱德蔚, 王登社, 等. 马铃薯 2n 配子发生的遗传分析 [J]. 园艺学报, 1995, 22(1): 61-66.
- [9] 夏平. 国外种质资源在我国马铃薯生产中的应用 [J]. 中国马铃薯, 2000, 14(1): 41-43.
- [10] 宋艳茹, 马庆虎, 侯林林. 转 PVY 外壳蛋白基因马铃薯及其田间实验 [J]. 植物学报, 1996, 38(9): 711-718.
- [11] 崔晓江, 彭学贤, 沈禹飞, 等. 马铃薯三价抗病毒基因表达载体的构建 [J]. 生物工程学报, 1994, (10): 185-189.
- [12] 项瑜, 扬兰英, 彭学贤, 等. 改造的马铃薯 Y 病毒复制酶基因介导高度抗病性 [J]. 生物工程学报, 1996, 12(3): 258-265.
- [13] 赵慧, 王道文. 马铃薯 Y 病毒属病毒 HC-pro 蛋白功能研究进展 [J]. 生物工程进展, 1999, 19(6): 53-57.
- [14] 董丽江, 哈斯阿古拉, 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒基因间隔区的克隆及序列分析 [J]. 中国病毒学, 1996, 11(2): 144-148.
- [15] Lamb J W, R T Hay. Ribozymes that cleave potato leafroll virus RNA within the coat protein and polymerase gene [J]. J Gen Virol, 1990, 71: 2257-2264.
- [16] 杨希才, 朱峰, 刘玉乐, 等. 抗马铃薯纺锤块茎类病毒的转核酶基因研究 [A]. 陈伊里. 中国马铃薯学术研讨文集 [C]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1996, 262-263.
- [17] 李爱丽, 马峙英. AFLP 分子标记与作物改良 [J]. 河北农业大学学报, 2001, 24(1): 89-95.